

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт морских биологических исследований  
им. А. О. Ковалевского

Геворгиз Р. Г.

**Количественное определение  
массовой доли хлорофилла *a* в сухой биомассе *Spirulina*  
(*Arthrospira*) *platensis* North. Geitl.**

Учебно-методическое пособие

Севастополь, 2017

УДК 582.232:58.082

ББК 28.591.2

Г–27

Р е ц е н з е н т : заведующий отделом экологической физиологии водорослей ФГБУН ИМБИ, доктор биологических наук, профессор  
З.З. Финенко

Геворгиз Р. Г.

Количественное определение массовой доли хлорофилла *a* в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. : учебно-методическое пособие / РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. — Севастополь, 2017. — 11 с. — (Препринт / РАН, ИМБИ).

В настоящем учебно-методическом пособии изложена подробная инструкция по определению массовой доли хлорофилла *a* в сухой биомассе спирулины. Уделено внимание возможным ошибкам при хранении проб, при пробоподготовке и измерениях. Приведены рекомендации по высушиванию сырой массы спирулины, а также по измерению концентрации хлорофилла *a* в биомассе спирулины, культивируемой в промышленных масштабах. Указаны оптимальные условия для экстракции и измерений хлорофилла *a*.

Пособие адресовано аспирантам и студентам всех специальностей.

Утверждено к публикации Учёным советом  
ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского»  
(протокол №12 от 18.12.2017 г.)

© Р. Г. Геворгиз, 2017

© ФГБУН ИМБИ, 2017

## Область и диапазон применения

Процедура описывает методику, которая позволяет определить массовую долю хлорофилла *a* в сухой (воздушно-сухой) биомассе спироулины. Определение доли хлорофилла требуется для исследований многих процессов жизнедеятельности фототрофов, поскольку содержание фотосинтетических пигментов в клетках является одним из ключевых показателей физиологического состояния клеток. Методика применима как для биомассы микроводорослей, выращенных в лабораторных условиях, так и для биомассы полученной в условиях производства. Описание методики сделано на примере *Spirulina (A.) platensis*, хотя она вполне применима и для других представителей сине-зелёных водорослей (цианобактерий).

## Терминология

*Хлорофилл a* — основной фотосинтетический пигмент высших растений, а также одноклеточных водорослей, в том числе прокариотических (Cyanophyta и Prochlorophyta).

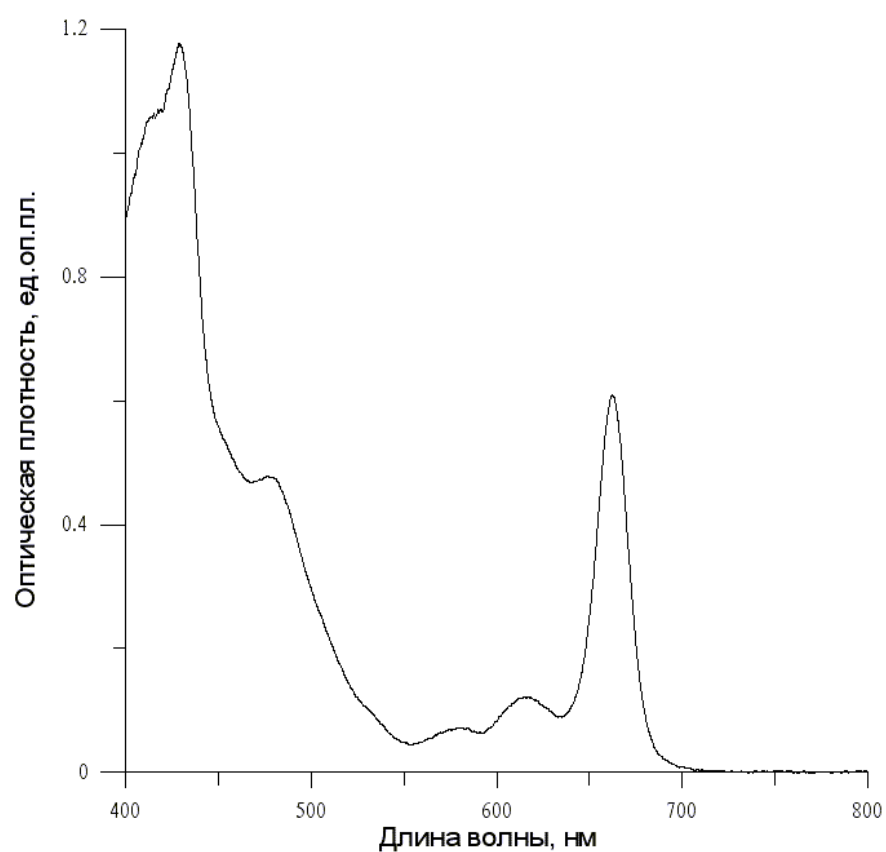
*Удельный коэффициент экстинкции* ( $\varepsilon_{\text{хл}}$ ) — оптическая плотность раствора вещества единичной концентрации (1 мг/мл) при толщине поглощающего слоя 1 см. Удельный коэффициент экстинкции характеризует способность растворённого вещества поглощать свет, он специфичен для каждого типа пигмента и растворителя. Зависит от длины световой волны. Единицы измерения<sup>1</sup> [мл · мг<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>].

*Сухая масса водорослей* — масса микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 105°C в течение 24 часов<sup>2</sup>.

*Воздушно-сухая масса* — масса микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 35–60°C в течение 6–12 часов. Обычно высушивают биомассу на полиэтиленовой плёнке до остаточной влажности 1–15%.

<sup>1</sup>Формально единицы измерений удельного коэффициента экстинкции записываются в виде [ед. опт. плотн. · мл · мг<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>], но на практике оптическую плотность, как безразмерную величину, опускают.

<sup>2</sup>В публикациях по микроводорослям иногда вместо термина «сухая масса» используются термины «абсолютно сухая масса водорослей» или «абсолютно сухой вес», которые по сути являются синонимами.



**Рис. 1.** Спектр поглощения ацетонового (100%) экстракта из биомассы *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Максимум поглощения в красной области приходится на 662,7 нм.

### Принцип метода

Оптическая плотность растворённого в ацетоне хлорофилла *a* в области максимума поглощения 662,7 нм пропорциональна удельному коэффициенту экстинкции  $\varepsilon_{\text{хл}} = 88,15 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [1].

### Сущность методики

После механического измельчения, к сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* приливают 100%-й ацетон, что приводит к экстракции всех жирорастворимых пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов). Затем ацетоновый экстракт помещают в измерительную кювету спектрофотометра и измеряют величину ослабления (пропускания) на длине волны 662,7 нм относительно кюветы со 100%-м ацетоном. Спектр ацетонового экстракта из сухой биомассы спирулины представлен на рисунке 1.

### Измеряемые величины

- $D_{662,7}, D_{730}$  — оптическая плотность в области максимума поглощения хлорофилла *a* (на длине волны 662,7 нм) и неспецифическое поглощение на длине волны 730 нм;
- $V$  — объём ацетонового экстракта, мл;
- $m$  — навеска воздушно-сухой биомассы *S. (A.) platensis*, мг;
- $k$  — доля воды в воздушно-сухой биомассе *S. (A.) platensis*, %;

### Оборудование

1. Автоматически регистрирующий спектрофотометр. Спектральный диапазон 400–800 нм, с кюветами в 1 см.
2. Центрифуга лабораторная. Фактор разделения 1500–5000 g.
3. Весы аналитические с погрешностью измерений до 0,0002 г.
4. Сушильный шкаф, диапазон температур 20–150 °С.
5. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозаторы.

**Замечание.** Рекомендуемые модели приборов приведены в [Приложении](#).

## Посуда

1. Мерный цилиндр объёмом 10 мл с абсолютной погрешностью  $\pm 0,2$  мл.
2. Центрифужные полимерные<sup>3</sup> пробирки с закручивающимися пробками, 8 шт.
3. Стеклянная палочка.
4. Фарфоровая или агатовая ступка с пестиком.

## Реактивы

1. Ацетон х.ч. (перегнанный).
2. Пищевая сода для мытья посуды.

## Ход работы

### Отбор проб

Суспензию спирулины фильтруют через газ с ячейёй 40–100 мкм. Полученную таким образом сырую биомассу (пасту) промывают дистиллированной водой (1 объём пасты к 1 объёму воды). Промывают биомассу водой 3–4 раза<sup>4</sup>. Затем пасту наносят тонким слоем (2–5 мм) на полиэтилен и высушивают в течение 6–10 часов при температуре 35–60 °С до воздушно-сухого состояния (обычно до остаточной влажности 5–15 %). Не рекомендуется высушивать водоросли при ярком освещении, чтобы не допустить разрушения пигментов.

### Подготовка проб к анализу

1. Посуду моют ёршиком с пищевой содой, затем тщательно промывают дистиллированной водой<sup>5</sup> и высушивают в сушильном шкафу<sup>6</sup>. В работе используют только сухую посуду.

<sup>3</sup> Следует обратить внимание на то, чтобы полимер был инертным, не мутнел и не растворялся при контакте с ацетоном.

<sup>4</sup> Объём воды подбирают таким образом, чтобы в сточной воде отсутствовали соли культуральной среды. Наличие солей в сточной воде можно определить посредством качественной реакции на ион карбоната  $\text{CO}_3^{2-}$ . Для этого в сточную воду добавляют 2 %-ный раствор  $\text{CaCl}_2$ . Если смесь становится мутной, тогда биомасса промыта недостаточно.

<sup>5</sup> Хромовой смесью мыть посуду не рекомендуется, т. к. это может приводит к занижению результатов измерений.

<sup>6</sup> Рекомендуется посуду перед сушкой промыть небольшим количеством спирта.

2. Воздушно-сухую биомассу *S. (A.) platensis* измельчают в ступке до грубого помола и отбирают «среднюю» пробу<sup>7</sup> для измерений.

### Определение содержания хлорофилла *a*

1. Навеску 7–10 мг измельчённой до грубого помола воздушно-сухой биомассы спирулины взвешивают на кальке<sup>8</sup> с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г и переносят в чистую сухую ступку.
2. К навеске дозатором приливают небольшое количество (0,5–1 мл) ацетона так, чтобы биомасса была увлажнена ацетоном, и тщательно растирают её пестиком в ступке. По мере испарения ацетона приливают ещё порцию 1–2 мл, продолжая процесс механического разрушения клеток. В результате из клеток экстрагируются пигменты.
3. Надосадочную жидкость количественно переносят в центрифужную пробирку<sup>9</sup>, при этом следят за тем, чтобы частицы биомассы оставались в ступке. Затем приливают следующую порцию ацетона (1–2 мл) и продолжают растирать биомассу в ступке. Таким образом поступают до полного извлечения пигментов из биомассы, т. е. до тех пор, пока экстракт не будет оставаться бесцветным. Обычно для полной экстракции пигментов из навески 7–10 мг достаточно 5–6 мл ацетона.
4. После экстрагирования пигментов раствор центрифугируют 10–15 минут при 1500–5000 g (3000–5000 об/мин) для осаждения нерастворившихся частиц.
5. Измеряют объём экстракта.
6. Измеряют оптическую плотность экстракта на длине волны 662,7 нм<sup>10</sup> и неспецифическое поглощение на длине волны 730 нм.  
*Замечание.* Обычно из-за большой концентрации пигментов в пробе оптическая плотность экстракта находится за пределами допустимого для измерений оптической плотности диапазона (т. е. превышает

<sup>7</sup>Для получения статистически достоверного результата в работе используют 6–10 параллельных измерений.

<sup>8</sup>Поскольку на кальке остаются следы биомассы, кальку следует взвешивать после перенесения навески в ступку.

<sup>9</sup>Для этой цели используют стеклянную пипетку или дозатор с тонким наконечником.

<sup>10</sup>Следует отметить, что в зависимости от чистоты растворителя и массовой доли воды в воздушно-сухой биомассе спирулины максимум на длине волны 662,7 нм может смещаться на 0,2–5 нм и более в длинноволновую область.

0,8 ед. опт. пл.). Поэтому аликвоту экстракта разбавляют ацетоном<sup>11</sup> таким образом, чтобы значения оптической плотности попадали в диапазон наименьшей погрешности измерений 0,4–0,5 ед. опт. пл.

7. Для учёта доли воды в воздушно-сухой массе водорослей навеску 1–2 г воздушно-сухой биомассы помещают в бюкс и высушивают при 105 °С в течение 24 ч. Учитывая массу бюкса, по разнице весов до и после высушивания рассчитывают долю воды в биомассе.

### Обработка результатов

Массовую долю хлорофилла *a* рассчитывают, используя нижеследующее выражение:

$$C_{\text{хл}} = \frac{1}{\varepsilon_{\text{хл}}} \cdot \frac{\Delta D \cdot V_{\text{экстракт}}}{l \cdot m_{\text{навеска}} \cdot (1 - k)} \cdot 100\%; \quad k = \frac{m_{\text{навеска}} - m_{\text{асв}}}{m_{\text{навеска}}};$$

$$[C_{\text{хл}}] = \left[ \frac{\text{см} \cdot \text{мг}}{\text{мл}} \cdot \frac{\text{ед. опт. плотн.} \cdot \text{мл}}{\text{см} \cdot \text{мг}} \right].$$

где  $\varepsilon_{\text{хл}} = 88,15$  — удельный коэффициент экстинкции для хлорофилла *a* в 100%-м ацетоне,  $\text{мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $\Delta D$  — оптическая плотность экстракта с учётом неспецифического поглощения,  $\Delta D = D_{662,7} - D_{730}$ , ед. опт. плотн.;  $V_{\text{экстракт}}$  — объём экстракта, мл;  $l$  — длина светового пути (измерительной кюветы), см;  $m_{\text{навеска}}$  — масса воздушно-сухой навески водорослей, мг;  $m_{\text{асв}}$  — навеска после высушивания до постоянного веса при 105 °С;  $k$  — массовая доля воды в воздушно-сухой навеске.

**Пример расчёта.** В нижеследующей таблице приведены результаты восьмикратного измерения массовой доли хлорофилла *a* в воздушно-сухой биомассе спироурины (массовая доля воды в воздушно-сухой биомассе  $k = 0,12$ ).

Среднее значение:

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^8 C_i}{8} = 1,838.$$

Минимальное значение: 1,754.

Максимальное значение: 1,922.

Промахи: для  $P = 0,95$  выборка сверху и снизу однородна.

<sup>11</sup>Если в биомассе содержится порядка 1 % хлорофилла *a*, то разбавление делают 1:3 непосредственно в измерительной кювете.



Несмещённая средняя квадратичная ошибка:

$$S_8 = \sqrt{\frac{\sum_1^8 (\bar{C} - C_i)^2}{8 - 1}} = 0,063.$$

Коэффициент вариации:

$$V = \frac{S_8}{\bar{C}} \cdot 100\% = \frac{0,063}{1,838} \cdot 100\% = 3,41\%.$$

Доверительный интервал для среднего:

$$P \left( \bar{C} - 2,36 \frac{0,063}{\sqrt{8}} < C < \bar{C} + 2,36 \frac{0,063}{\sqrt{8}} \right) = 0,95,$$

$$P(1,82 - 0,05 < C < 1,82 + 0,05) = 0,95.$$

$$C = 1,82 \pm 0,05.$$

№	Навеска, г	Объём экстракта, мл	$\Delta D$	СМ, г	$C$ , %
1	0,0087	20,8	0,569	0,00766	1,754
2	0,00975	21,6	0,64	0,00858	1,828
3	0,0106	23,2	0,659	0,00933	1,860
4	0,00985	27,6	0,503	0,00867	1,817
5	0,01235	29,6	0,568	0,01087	1,755
6	0,0095	22,8	0,617	0,00836	1,909
7	0,01045	32,8	0,475	0,00919	1,922
8	0,011	23,2	0,683	0,00968	1,857

### Рекомендации по избежанию ошибок

1. Чтобы избежать занижения результатов, следует учесть, что ацетоновые экстракты не подлежат хранению. Поэтому время между получением экстрактов и измерением оптической плотности и объёма должно быть минимальным.
2. Не следует проводить измерения хлорофилла *a* в условиях повышенной освещённости и при высокой температуре в лаборатории, поскольку в таких условиях пигменты разрушаются. Кроме того, при высокой температуре значительно увеличивается разброс данных и расход ацетона.
3. Особое внимание следует уделять чистоте ацетона. Любые примеси изменяют значение удельного коэффициента экстинкции.

## Приложение

### Рекомендуемое оборудование

1. Автоматически регистрирующий СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Спектральный диапазон — 200–1100 нм. Диапазон измерений спектральных коэффициентов направленного пропускания — 1–100% с абсолютной погрешностью не более 1%. Предел допускаемого значения среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности спектрофотометра при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания — 0,2 %. Набор кварцевых кювет, входящий в комплект поставки прибора.
2. Центрифуга лабораторная ОПН-3 с радиусом ротора  $r = 0,09$  м и центрифужными пробирками  $l = 0,07$  м. Частота обращения ротора — 1000, 1500, 3000 об/мин. Допускаемое приведённое отклонение заданной частоты вращения не более  $\pm 10$  %. Центробежное ускорение равно  $a = \omega^2 \cdot R$ , где  $\omega$  — угловая скорость, об/с;  $\omega = 2\pi n$ , где  $n$  — частота обращения ротора, об/с,  $R = r + l$  — радиус ротора плюс длина центрифужной пробирки. Фактор разделения для скорости в 3000 об/мин,  $\Phi_{3000} = (2 \times \pi \times 3000/60)^2 \times 0,16/9,8 = 1611 g$ .
3. Весы аналитические ВЛР-200, 0–200 г, 2-й класс. Набор разновесок Г 2–210, 0–200 г, класс 2.
4. Сушильный шкаф стерилизационный сухожаровый СНОЛ ШС-58/350;
5. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозатор Biohit, 1000–5000 мкл с погрешностью измерения не более  $\pm 1$  % и 100–1000 мкл с погрешностью не более  $\pm 1$  %.

### Список литературы

1. Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls  $a$ ,  $b$ ,  $c_1$ , and  $c_2$  in higher plants, algae and natural populations // Biochem. Physiol. Pflanzen. — 1975. — Vol. 167. — P. 191–194.

Геворгиз Руслан Георгиевич  
e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

R. G. Gevorgiz

Quantitative determination of the mass fraction of chlorophylls *a* in dry biomass of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. — Sevastopol, 2017. — 11 p. — (Working paper / RAS, IMBR).

This training aid provides detailed instructions on the quantitative determination of the mass fraction of chlorophylls *a* in the dry biomass of spirulina. Possible errors in the storage of samples, in sample preparation and in measurements are highlighted. The aid contains recommendations for drying the wet weight of spirulina, as well as for measuring the concentration of chlorophylls *a* in spirulina biomass cultivated on an industrial scale. Optimum conditions for measurements are specified.

The training aid is addressed to students and postgraduates of all specialties.